

## CAGED HYDROXYPHENYLPROPIONIC ACID AND ITS DERIVATIVE

Publication number: JP11029533

Publication date: 1999-02-02

Inventor: SHIONO HIROBUMI; NODA HITOSHI; UTSUYAMA  
CHIKA

Applicant: BUNSHI BIO PHOTONICS KENKYUSHO

Classification:

- international: C07C205/37; C07C217/60; C07C229/36; C07C205/00;  
C07C217/00; C07C229/00; (IPC1-7): C07C205/37;  
C07C217/60; C07C229/36

- european:

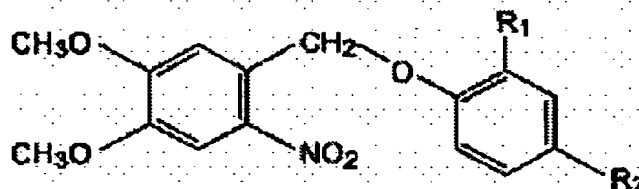
Application number: JP19970185168 19970710

Priority number(s): JP19970185168 19970710

Report a data error here

## Abstract of JP11029533

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a novel compound that has a phenolic hydroxyl group protected with a protecting group, is stable under usual peroxidase enzymatic reaction conditions and can quantitatively liberate hydroxyphenylpropionic acid under irradiation with light. **SOLUTION:** This novel compound is represented by the formula [R1 is H, CH3 O, OH; R2 is CH2 CH2 CO2 H, CH2 COOH, CH2 CH2 NH2, CH2 CH(NH2)CO2 H, CH2 CH2 OH, CH2 CH2 N(CH3)2, CH2 CH3], typically 4-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-phenylpropionic acid. The compound of the formula is prepared, for example, by allowing 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl compound that is replaced with an eliminating group as a halogen or tosylate group to react with hydroxyphenylpropionic acid or its derivative in the presence of a weak base to etherify the phenolic hydroxyl group with 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl group thereby attaining protection.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**THIS PAGE LEFT BLANK**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-29533

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月2日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 0 7 C 205/37

C 0 7 C 205/37

217/60

217/60

229/36

229/36

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-185168

(22) 出願日 平成9年(1997) 7月10日

(71) 出願人 595047385

株式会社分子バイオホトニクス研究所  
静岡県浜北市平口5000番地

(72) 発明者 塩野 博文

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内

(72) 発明者 能田 均

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内

(72) 発明者 宇津山 千佳

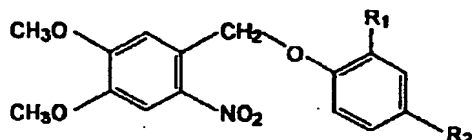
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外4名)

(54) 【発明の名称】 ケージドヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 一般式1のケージドヒドロキシフェニルプロピオン酸 (HPPA) 及びその誘導体。



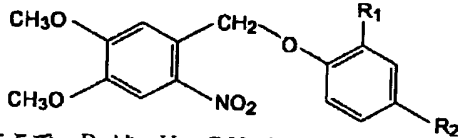
(R<sub>1</sub> はH、CH<sub>3</sub> O又はOH、R<sub>2</sub> はCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> C O<sub>2</sub> H、CH<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> H、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> NH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub> CH (NH<sub>2</sub>) CO<sub>2</sub> H、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> OH、CH<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> N (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> OH、CH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub> OH、CH (OH) CO<sub>2</sub> H、H又はCO<sub>2</sub> Hを表す。)

【効果】 本ケージドHPPAはフェノール性水酸基を保護され、通常のペルオキシダーゼ酵素反応条件下で極めて安定であり、かつ光解離性のケージド化による保護基であることから光照射により定量的にHPPAを溶液中に遊離可能となり、ペルオキシダーゼ-過酸化水素アッセイ系に好ましく適用できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式で表される構造を有するケージドヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体。

【化1】



(ここで、 $R_1$ は、 $H$ 、 $CH_3O$ 、 $OH$ のいずれかを表し、 $R_2$ は $CH_2CH_2CO_2H$ 、 $CH_2CO_2H$ 、 $CH_2CH_2NH_2$ 、 $CH_2CH(NH_2)CO_2H$ 、 $CH_2CH_2OH$ 、 $CH_2CH_2N(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $CH_3$ 、 $OCH_3$ 、 $CH_2OH$ 、 $CH(OH)CO_2H$ 、 $H$ 、 $CO_2H$ のいずれかを表す。)

【請求項2】 フェノール基が4、5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル基で保護された以下のヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体。3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、p-ヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸、チラミン、チロシン、p-ヒドロキシフェニルエチルアルコール、ホルデニン、p-エチルフェノール、3-(p-ヒドロキシフェニル)-1-プロパノール、p-クレゾール、p-n-プロピルフェノール、ホモバニリルアルコール、3-メトキシチラミン、3-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、2-メトキシ-4-メチルフェノール、p-ヒドロキシベンジルアルコール、バニリルアルコール、バニリル酢酸、2-メトキシフェノール、p-ヒドロキシ安息香酸、p-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸、p-ヒドロキシマンデル酸、3,4-ジヒドロマンデル酸、3-メトキシチロシン、p-アミドアセトフェノール、p-プロピオンアミドフェノール、p-ブチルアミドフェノール、p-ブチルアミドフェノール、p-バレロアミドフェノール、4-アセトアミド-2-メチルフェノール、4-メトキシカルバミドフェノール、4-エトキシカルバミドフェノール、3-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)プロピオン酸、4-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)ブタン酸、5-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)ペンタン酸、2-(カルボキシメトキシ)-4'-ヒドロキシアセタニリド、4-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)-3-メチルブタン酸。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ケージドヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体に関するものであって、より詳しくは、ヒドロキシフェニルプロピオン酸(HPPA)及びその誘導体のヒドロキシ基を4、5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル基で保護したケージド化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】 臨床検査における免疫検査法や核酸プローブ法による検査において、抗体や核酸プローブの標識酵素として、また、酸化酵素利用の生体内物質の検出用酵素としてペルオキシダーゼは広く使用される酵素として知られている。係るペルオキシダーゼを最も感度の高い蛍光法で検出するための試薬として、ヒドロキシフェニルプロピオン酸(HPPA)が使用されている。

【0003】 しかし、HPPAは保存安定性、特に溶液中での保存安定性が著しく悪いという問題点がある。HPPAの係る保存安定性を改善するために、HPPAを含む溶液中に種々の安定化剤を添加する方法(特開平8-2108577)が知られているが十分ではない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは以上の問題点を解決するために鋭意研究し、酸素等が高い反応性を示すHPPAのフェノール性水酸基を、適当な保護基で保護することで、極めて化学的に安定なHPPAの誘導体を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

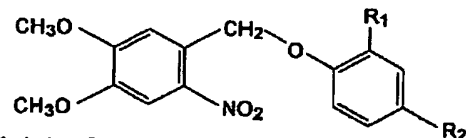
【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明に係る、HPPA及びその誘導体は、フェノール性水酸基を有することを特徴とする化合物群であり、フェノール性水酸基の隣接位置にさらにメトキシ基や水酸基を有する構造を有する化合物群も含むものである。さらに、本発明に係る、HPPA及びその誘導体は、前記水酸基に対しパラ位置の種々のアルキル基等の置換基を有する構造を有するものである。

【0006】 本発明に係るケージドヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体は、前記化合物群のフェノール性水酸基を、4、5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル基でエーテル結合により保護基化(以下ケージド化という)により安定化させた構造を有するものである。より詳しくは、本発明は、次式で表される構造を有するケージドヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体を提供するものである。

【0007】

【化1】



【0008】 (ここで、 $R_1$ は、 $H$ 、 $CH_3O$ 、 $OH$ のいずれかを表し、 $R_2$ は $CH_2CH_2CO_2H$ 、 $CH_2CO_2H$ 、 $CH_2CH_2NH_2$ 、 $CH_2CH(NH_2)CO_2H$ 、 $CH_2CH_2OH$ 、 $CH_2CH_2N(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH_3$ 、 $CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $CH_3$ 、 $OCH_3$ 、 $CH_2OH$ 、 $CH(OH)CO_2H$ 、 $H$ 、 $CO_2H$ のいずれかを表す。)

さらに、本発明は、フェノール基が4、5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル基で保護された以下のヒドロキシ

フェニルプロピオン酸及びその誘導体を提供するものである。

【0009】3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、p-ヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸、チラミン、チロシン、p-ヒドロキシフェニルエチルアルコール、ホルデニン、p-エチルフェノール、3-(p-ヒドロキシフェニル)-1-プロパノール、p-クレゾール、p-n-プロピルフェノール、ホモバニリルアルコール、3-メトキシチラミン、3-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、2-メトキシ-4-メチルフェノール、p-ヒドロキシベンジルアルコール、バニリルアルコール、バニリル酢酸、2-メトキシフェノール、p-ヒドロキシ安息香酸、p-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸、p-ヒドロキシマンデル酸、3,4-ジヒドロマンデル酸、3-メトキシチロシン、p-アミドアセトフェノール、p-プロピオンアミドフェノール、p-ブチルアミドフェノール、p-ブチルアミドフェノール、p-バレロアミドフェノール、4-アセトアミド-2-メチルフェノール、4-メトキシカルバミドフェノール、4-エトキシカルバミドフェノール、3-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)プロピオン酸、4-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)ブタン酸、5-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)ペンタン酸、2-(カルボキシメトキシ)-4'-ヒドロキシアセタニリド、4-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)-3-メチルブタン酸。

【0010】以下本発明を実施の形態に即し詳細に説明する。

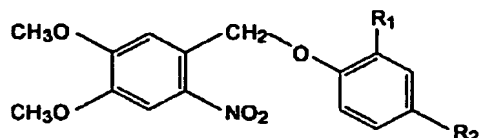
【0011】

【発明の実施の形態】

(ヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体) 本発明においてケージド化により安定化されるHPPA及びその誘導体については特に制限はなく、フェノール性水酸基を有している化合物であればよいが、本発明に係るケージドヒドロキシフェニルプロピオン酸及びその誘導体を、ペルオキシダーゼを蛍光法により検出するために使用する目的では、該酵素反応生成物が十分な蛍光を有するものであることが必要であり、この観点からは、以下の式で示される化合物が好ましい。

【0012】

【化1】



【0013】(ここで、R<sub>1</sub>は、H、CH<sub>3</sub>O、OHのいずれかを表し、R<sub>2</sub>はCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H、CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、CH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>O

H、CH(OH)CO<sub>2</sub>H、H、CO<sub>2</sub>Hのいずれかを表す。)

特に、該酵素反応生成物の蛍光強度が大きい観点から、上記の化合物のうち、以下のHPPA及びその誘導体が特に好ましい。

【0014】3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、p-ヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸、チラミン、チロシン、p-ヒドロキシフェニルエチルアルコール、ホルデニン、p-エチルフェノール、3-(p-ヒドロキシフェニル)-1-プロパノール、p-クレゾール、p-n-プロピルフェノール、ホモバニリルアルコール、3-メトキシチラミン、3-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、2-メトキシ-4-メチルフェノール、p-ヒドロキシベンジルアルコール、バニリルアルコール、バニリル酢酸、2-メトキシフェノール、p-ヒドロキシ安息香酸、p-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸、p-ヒドロキシマンデル酸、3,4-ジヒドロマンデル酸、3-メトキシチロシン、p-アミドアセトフェノール、p-プロピオンアミドフェノール、p-ブチルアミドフェノール、p-ブチルアミドフェノール、p-バレロアミドフェノール、4-アセトアミド-2-メチルフェノール、4-メトキシカルバミドフェノール、4-エトキシカルバミドフェノール、3-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)プロピオン酸、4-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)ブタン酸、5-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)ペンタン酸、2-(カルボキシメトキシ)-4'-ヒドロキシアセタニリド、4-(4-ヒドロキシフェニルカルバモイル)-3-メチルブタン酸。

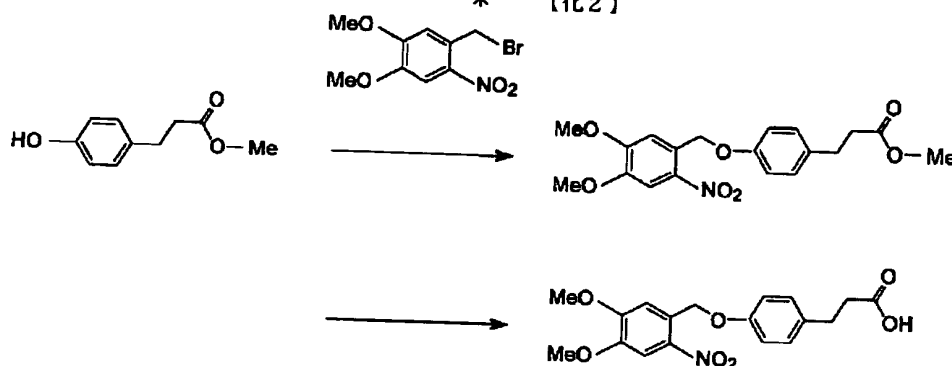
【0015】ここで、フェノール水酸基の隣接位置は、H、OH又はメトキシ基であり、係る構造を有する化合物は、ペルオキシダーゼ酵素反応生成物が十分な強度の蛍光を発することが可能である。

【0016】さらに、前記フェノールの水酸基のpara位置の置換基は、ペルオキシダーゼの酵素反応に使用可能な構造を有する必要から、例えばCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H、CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、CH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>OH、CH(OH)CO<sub>2</sub>H、H、CO<sub>2</sub>Hであることが好ましい。

【0017】(ケージド化反応) 本発明に係るフェノール性水酸基を、4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル基でエーテル結合を形成して保護基化する方法については特に制限はない。通常の化学反応によりフェノール性水酸基のエーテル結合形成反応を使用可能である。具体的には、次式で示すように一般的に適当な脱離基で置換した4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル体と、HPPA及びその誘導体との弱塩基の存在下での反応により好ましく合成可能である。係る場合の脱離基として

5 は、ハロゲン (Cl, Br, I)、トシレート等が挙げられる。

\* 【0018】  
【化2】



【0019】上記エーテル結合形成反応に使用可能な反応溶媒は、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドのような非プロトン性極性溶媒が好ましく特にアセトンの使用が好ましい。また、使用する塩基としては有機物塩基、無機塩基物のどちらでもよいが、無機塩基物の使用が好ましく具体的には炭酸カリウム等が挙げられる。反応温度及び、反応時間についても特に制限はなく、反応をTLC、HPLC等の方法でモニターし、原料としてのHPPAが消失した時点で反応の完結と判断可能である。反応溶液から、反応溶媒を減圧で除いた後、再結晶、カラムクロマトグラフ等の精製分離手段を用いて単離可能である。

【0020】さらに、前記フェノールの水酸基のバラ位置の置換基により、上記のエーテル結合形成反応が阻害され得るものとしては、カルボン酸、ヒドロキシ基、アミノ基を有する誘導体であるが、係る場合には、適当な保護基であらかじめ保護しておき、エーテル結合形成後に該保護基を脱離することが可能である。具体的には、カルボン酸の場合には、適当なアルコール等によるエス

※ エーテル結合により保護することが可能であり、ヒドロキシ基の場合にはアシル基によるエステル基による保護が可能であり、アミノ基の場合にはアシル基によるアミド基による保護基化が可能となる。

【0021】(HPPA体の発生及びペルオキシダーゼ-過酸化水素酵素反応の検出) 本発明に係るケージドHPPA及びその誘導体のフェノール性水酸基のエーテル結合によるケージド化(保護基化)は、通常の化学反応条件に対しては極めて安定である。具体的には、酸素、過酸化水素等の酸化物との共存条件でも全く酸化されない。

【0022】一方、4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルエーテル結合は、光照射により容易に光開裂し、HPPAを遊離する。さらに、照射光のエネルギーに依存して遊離されるHPPAの濃度が増加する。上記の光開裂反応は、HPLCを用いることで容易にモニター可能である。具体的には、以下のHPLC条件が好ましく使用可能である。

【0023】

=====  
試料溶液：ケージドHPPA、3.6mM/リン酸緩衝液(pH8.0)

HPPA (和光純薬)、3.6mM/リン酸緩衝液(pH8.0)

HPLC：カラム、ODSφ4.6mm×250mm (SHISEIDO CapcellPacC18)

移動相、アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸水溶液(20/80から60/40に、0から20分)

照射条件：試験管に試料10μl入れ、上部から、360nm光を照射した後、HPLC移動相にて10倍希釈してHPLC分析。

保持時間：ケージドHPPA (254nm吸収検出)、21.6分

HPPA (励起285nm、305nm蛍光検出)、6.8分  
=====

【0024】さらに、照射光の照射エネルギーを調節することで、必要なHPPAの遊離濃度を制御することが可能となる。具体的には、ケージドHPPAをペルオキシダーゼ-過酸化水素酵素反応の検出試薬として使用する場合は、被測定酵素反応溶液に、上記ケージドHPPAを添加し、その後、適当な波長の光で照射することによりその溶液中に直接HPPAを適当な濃度で発生させ

ることとなる。従って、HPPAが極めて純度の高い状態で該酵素反応に使用されることにより、バックグラウンドの低い蛍光検出が可能となるものである。図1に、酵素反応溶液(ペルオキシダーゼ8μg/ml、過酸化水素0.3g/l)中に、ケージドHPPAを0.36mM添加した溶液を、360nmの波長の光照射した後の該溶液の相対蛍光強度を示した。光照射しない条件では、明らかに酵素反応

は全く検出されないが、光照射により、その結果該酵素反応が検出可能となり、HPPAが発生していることが示された。

【0025】

【実施例】以下実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

【0026】(実施例1)

4-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルオキシ)-フェニルプロピオン酸メチルエステルの合成

4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルブロミド(アルドリッチ社製)10.0gと、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸メチルエステル(アルドリッチ社製)6.5gをアセトン100mlに溶解し、得られた溶液に炭酸カリウム7.6gを加えて18時間環流した。不溶物を濾過した後、濾液から反応溶媒を減圧で除き、得られた粗生成物に酢酸エチル400mlを加えて溶解し、得られた溶液を水、飽和食塩水で洗浄した。得られた溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧で除いた。得られた褐色の粗生成物をエタノールから再結晶して、結晶として4-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルオキシ)-フェニルプロピオン酸メチルエステルを得た(収率90%)。

【0027】赤外線吸収スペクトル(KBr): 1735 $\text{cm}^{-1}$ (メチルエステル基)、1523, 1513 $\text{cm}^{-1}$ (ニトロ基)、1220, 1070 $\text{cm}^{-1}$ (メトキシ基)。

【0028】TOF-MS(島津製作所製、MALDI I V): 375(M/C)。

【0029】 $^1\text{H-NMR}$ (重クロロホルム、 $\delta$  ppm): 7.77(s, 1H, ニトロベンジルの芳香族プロトン)、7.35(s, 1H, ニトロベンジルの芳香族プロトン)、6.93(d, 2H, フェニルプロピオン酸芳香族プロトン)、5.47(s, 2H, ベンジルプロトン)、3.96(s, 3H, メトキシ)、3.95(s, 3H, メトキシ)、3.67(s, 3H, エステルメチル基)、2.91(t, 2H, プロピオン酸3位メチレン)、2.61(t, 2H, プロピオン酸2位メチレン)。

【0030】(実施例2)

4-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルオキシ)-フェニルプロピオン酸の合成

4-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルオキシ)-フェニルプロピオン酸メチルエステル3.7gをメタノール180mlに溶解し、1規定水酸化ナトリウム水溶液64mlを加えて、40°Cにて攪拌して一夜反応させた。反応溶媒を50ml程度になるまで減圧で除き、得られた溶液に1規定塩酸を添加し、溶液のpHを2に調整した。さらに、酢酸エチル100mlを加えて抽出し、得られた酢酸エチル層を水、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、酢酸エチルを減圧で除き、粗生成物を得た。得られた粗生成物を酢酸エチルから再結晶することにより4-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルオキシ)-フェニルプロピオン酸を3.6g(定量的)得た。

【0031】赤外線吸収スペクトル(KBr): 1709 $\text{cm}^{-1}$ (カルボン酸)、1515 $\text{cm}^{-1}$ (ニトロ基)、1218, 1070 $\text{cm}^{-1}$ (メトキシ基)。

【0032】TOF-MS(島津製作所製、MALDI I V): 361(M/C)。

【0033】 $^1\text{H-NMR}$ (重DMSO、 $\delta$  ppm): 12.07(bs, 1H, カルボン酸OH)、7.71(s, 1H, ニトロベンジルの芳香族プロトン)、7.32(s, 1H, ニトロベンジルの芳香族プロトン)、7.15(d, 2H, フェニルプロピオン酸芳香族プロトン)、6.93(d, 2H, フェニルプロピオン酸芳香族プロトン)、5.37(s, 2H, ベンジルプロトン)、3.88(s, 3H, メトキシ)、3.87(s, 3H, メトキシ)、2.77(t, 2H, プロピオン酸3位メチレン)、2.49(t, 2H, プロピオン酸2位メチレン)。

【0034】紫外線吸収(リン酸緩衝液(pH8.0)中):  $\lambda_{\text{max}}$ 346nm( $\epsilon$  6.04 $\times 10^4$ )。

【0035】(実施例3)本発明に係るケージドHPPAと、ペルオキシダーゼ-過酸化水素酵素反応実験試薬の調整:

(1) 0.36mM ケージドHPPA/100mMリン酸緩衝液(DMSO2%含有)は、0.0021gケージドHPPAを0.33mlに溶解し、100mMリン酸緩衝液(pH8.0)にて16.5mlにした。

【0036】(2) 0.36mM HPPA/100mMリン酸緩衝液は、0.0060gHPPA(同仁化学研究所社製)を溶解して100mlにした。

【0037】(3) 8 $\mu\text{g/ml}$ ペルオキシダーゼ希釈液(和光純薬社製)は、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを10mMリン酸緩衝液(NaCl138mM, KCl2.7mM, BSA1%w/v, pH7.4)で希釈した。

【0038】(4) 0.3g/l過酸化水素水実験条件:

(A) ケージドHPPA/リン酸緩衝液1000 $\mu\text{l}$ を10mm $\times$ 10mmの蛍光測定用セルに入れ、このセルを360nm紫外線200mJ/cm $^2$ で照射した。

【0039】上記照射したケージドHPPA/リン酸緩衝液100 $\mu\text{l}$ と酵素希釈液10 $\mu\text{l}$ を混合し、30°Cにて5分間インキュベートした。さらに、過酸化水素水50 $\mu\text{l}$ を添加し、30°Cで30分間反応させた。得られた溶液に100mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液pH9.2を2.5ml加え、励起光320nmにて蛍光スペクトルを測定した。

【0040】(B)ケージドHPPA/リン酸緩衝液1000 $\mu\text{l}$ を10mm $\times$ 10mmの蛍光測定用セルに入れ、このセルを360nm紫外線400mJ/cm $^2$ で照射した。

【0041】上記照射したケージドHPPA/リン酸緩衝液100 $\mu\text{l}$ と酵素希釈液10 $\mu\text{l}$ を混合し、30°Cにて5分間インキュベートした。さらに、過酸化水素水50 $\mu\text{l}$ を添加し、30°Cで30分間反応させた。得られた溶液に100mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液pH9.2を2.5ml加え、励起光320nmにて蛍光スペクトルを測定した。

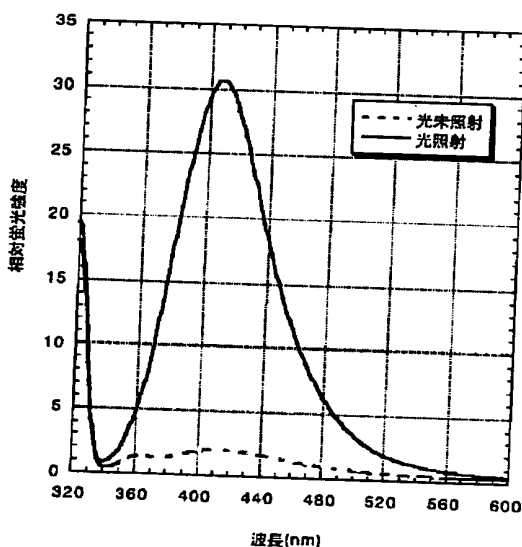
【0042】(C) ケージドHPPA/リン酸緩衝液100 $\mu$ lと酵素希釈液10 $\mu$ lを混合し、30°Cにて5分間インキュベートし、360nm紫外線200mJ/cm<sup>2</sup>で照射した。さらに、過酸化水素水50 $\mu$ lを添加し、30°Cで30分間反応させた。得られた溶液に100mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液pH9.2を2.5ml加え、励起光320nmにて蛍光スペクトルを測定した。

【0043】(D) ケージドHPPA/リン酸緩衝液100 $\mu$ lと酵素希釈液10 $\mu$ lを混合し、30°Cにて5分間インキュベートし、360nm紫外線400mJ/cm<sup>2</sup>で照射した。さらに、過酸化水素水50 $\mu$ lを添加し、30°Cで30分間反応させた。得られた溶液に100mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液pH9.2を2.5ml加え、励起光320nmにて蛍光スペクトルを測定した。

【0044】(E) ケージドHPPA/リン酸緩衝液100 $\mu$ lと酵素希釈液10 $\mu$ lを混合し、30°Cにて5分間インキュベートした。光照射することなくさらに、過酸化水素水50 $\mu$ lを添加し、30°Cで30分間反応させた。得られた溶液に100mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液pH9.2を2.5ml加え、励起光320nmにて蛍光スペクトルを測定した。

【0045】上記条件(A)～(E)までの結果を図2にまとめて示した。

【図1】



\*【0046】(F) HPPA/リン酸緩衝液100 $\mu$ lと酵素希釈液10 $\mu$ lを混合し、30°Cにて5分間インキュベートした。さらに、過酸化水素水50 $\mu$ lを添加し、30°Cで30分間反応させた。得られた溶液に100mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液pH9.2を2.5ml加え、励起光320nmにて蛍光スペクトルを測定した。結果を図3に示した。

【0047】

【発明の効果】以上、本発明に係るケージドHPPAは、フェノール製水酸基を保護基で保護され、通常のペルオキシダーゼ酵素反応条件下で極めて安定であり、かつ光解離性のケージド化による保護基であることから、光照射により定量的にHPPAを溶液中に遊離することが可能となり、ペルオキシダーゼ-過酸化水素アッセイ系に好ましく適用可能であることが確認された。

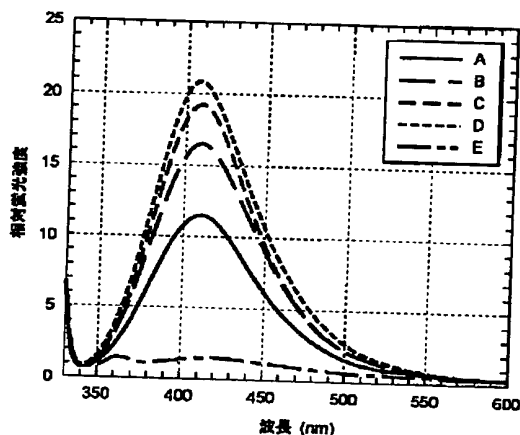
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るケージドHPPAが、光照射により、ペルオキシダーゼ-過酸化水素酵素反応の検出に使用可能であることを示す図である。

【図2】本発明に係るケージドHPPAによるペルオキシダーゼ-過酸化水素酵素反応の検出結果を示す図である。

【図3】HPPAによるペルオキシダーゼ-過酸化水素酵素反応の検出結果を示す図である。

【図2】

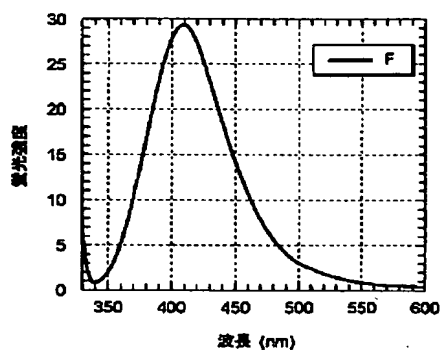




(7)

特開平 11-29533

【図 3】



BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE LEFT BLANK**